*本製品は研究用キットです。診断、治療目的には使用しないで下さい。
*下記 web 上に掲載しているプロトコールの最新版を確認の上、操作して下さい。
http://metallogenics.co.jp/

測定原理

本法は Ellman 試薬(DTNB:5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid))とチオール(SH)基との反応による可視部(412nm)の発色を観測し、SH 基の量を求めるものです。DTNB は SH 基と反応し、5-Mercapto-2-nitrobenzoic acid を生成します。この生成物の波長 412nm における吸光度を測定することにより、試料中のチオール濃度を求めます [1]。

測定の意義

チオール基は生体中ではアルブミン等のタンパク質、グルタチオン、遊離チオール基として存在しています。チオールは強い還元能を持ち、活性酸素種に速やかに応答し、活性酸素を消去し、ジスルフィドとなります。タンパク質チオール基は他のアミノ酸側鎖と比較して酸化修飾を受けやすく、いくつかのタンパク質や酵素が、チオール機の酸化還元状態により、機能を制御されています。
血清中のチオール濃度は生体内のレドックス環境の指標の 1 つであり、酸化ストレスマーカーとしても着目されています。がんや肝疾患など、様々な疾患において血清チオール濃度が低下していることが報告されており、血清チオール濃度が疾病・老化などに関わる指標となる可能性が示唆されています。

キット内容

合計 200 測定分

①	R-A	緩衝液	🔴	40mL
②	R-B	発色液(DTNB 溶液)	🟡	6mL
③	標準試料	N-アセチルシステイン (凍結乾燥品：チオールとして 1mM)	🟢	バイアル 1 本

測定試料の注意点

- 血清サンプルは新鮮なもの又は-20°C 以下で保存したものを使用して下さい。
- 溶血試料は使用しないで下さい。
- 酸抽出試料等はあらかじめ pH2 以上に調整したものを使用して下さい。
- ライセートなど懸濁している場合は遠心分離等により清澄化したものを使用して下さい。
- 測定レンジ以上の高濃度の検体は適当に希釈したものをアッセイ検体としてください。
- 本製品は、その得られる数値を保証するものではありません。
  応用される際は最適パラメータを試料種ごとに検討の上、ご使用されることをお奨め致します。

測定に必要な器具・試薬

- マイクロプレートリーダー
- マイクロプレート（96 穴ウェル）
- マイクロピペット（20、30、200 µL 分注量）
- 精製水

操作方法

1. 試薬の準備
   1）標準物質の準備
   標準物質 1 瓶に対し蒸留水をラベルに表示されている量分注し、室温にて 30 分静置して溶解します。調製された標準物質は、冷凍にて一週間保管が可能です。ただし、凍結乾燥を繰り返さないで下さい。
   2） 緩衝液・発色液・停止液は常温に戻してから使用してください。
   *開封後は冷暗所（2-8℃）に保存し、1 ヶ月以内に使用して下さい。

2. 測定方法

プレートリーダー（紫外可視分光光度計）による定量（1 検体 250μL 容量）

以下の用量で精製水（または生理食塩水）、標準液、試料、緩衝液、発色液をウエルへ分注して下さい。

〇アッセイ

		アッセイ検体		
	添加する試薬・試料（μL）	試薬ブランク	標準試料	試　料
1	精製水 or 生理食塩水	20	-	-
	標準液	-	20	-
	試　料	-	-	20
2	緩衝液	200	200	200
	十分に混合し、所定波長の吸光度 OD1 を測定			
3	発色液	30	30	30
	十分に混合し、10 分後、所定波長の吸光度 OD2 を測定			

*ピペッティングにより泡が発生しないように丁寧に混合してください。泡が発生した場合はプレートミキサー等により除去してください。プレートミキサーのみによる混合、撹拌では再現性不良が発生する場合があります。
*標準液の濃度はカットオフ値、目的に合わせて、選択してください。但し 2.0mM 以上の試料では 2 倍～30 倍希釈したものをアッセイ検体としてください.
*アッセイボリュームを変更する場合は上記割合でアッセイして下さい。

測定条件（マイクロプレートリーダー）

測光波長（主波長）	412 nm (吸収極大波長)
感度のある波長域	380~440 nm
測定温度	25～37℃
ウエル	96 穴ウエル

*タンパク質低吸着タイプのウエルを使用してください。

〇濃度の算出方法

$$\frac{OD2_{試料} - OD1_{試料}}{OD2_{標準} - OD1_{標準}} = チオール濃度（mmol/L）$$

$OD_{試料}$：　試料の吸光度
$OD_{標準}$：　標準試料の吸光度
対照　：　試薬ブランク

主な仕様と性能

アッセイ数	100 検体
検出方法	呈色
測定範囲	0.05mM~2.0mM
測定波長	412 nm

品質保持期限と保存方法

本品の品質保持期限は製造後 12 ヶ月です。（冷蔵 2～8℃）
開封後、冷暗所（2-8℃）で保存し、1 ヶ月以内に使用して下さい。

参考文献

1.) Ellman GL “Tissue sulfhydryl groups.” *Arch. Biochem. Biophys. 82 (1): 70–7. (1959).*
2.) 柴長裕晴、吉原英治、松尾禎之、淀井淳司、”酸化ストレスとレドックス制御～タンパク質の酸化的修飾と活性調整～”*生物試料分析 Vol.32,No4,2009*
3.) Banne AF1, Amiri A, Pero RW. “Reduced Level of Serum Thiols in Patients with a Diagnosis of Active Disease. “*Journal of Anti-Aging Medicine.Vol.6, Number 4, 2003*

製造販売業者

メタロジェニクス 株式会社
千葉市中央区亥鼻 1-8-15　千葉大亥鼻イノベーションプラザ

問い合わせ先
メタロジェニクス株式会社　営業部
〒260-0856　千葉市中央区亥鼻 1-8-15　千葉大亥鼻イノベーションプラザ
TEL：　043-227-6767
FAX：　043-227-6768
e-mail：　sales@ak-j.com
URL:　http://metallogenics.co.jp/

※ 取扱説明書、測定プロトコール等、製品に関する最新の情報は、下記弊社 website のサポートコーナーで御確認下さい。
http://metallogenics.co.jp/
※ 本製品は研究用であり、その数値を完全に保証するものではございません。あらかじめご了承下さい。
※ 表記性能は汎用されているマイクロプレートリーダー、紫外可視分光光度計を用いた場合の目安です。使用機器の型式によっては完全に一致しない場合があります。あらかじめご了承下さい。
※ 品質に関してのお問い合わせの際は、試薬キット包装袋に貼付の Lot No.を御確認の上、お問い合わせ下さい。
※ 商品の仕様・サービス・包装形態・梱包形態・測定プロトコールは、予告なく変更する場合があります。本取扱説明書に従い、適切に御使用下さい。
※ 商品の輸送・取扱い・処理・廃棄については、付属の製品安全データシート（MSDS）に従って下さい。